

**Lucija Bedeniković**

# **Kromatografske tehnike analize piracetama i njegova elektrokemijska svojstva**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof.dr.sc. Biljane Nigović.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Biljani Nigović na mentorstvu te na uloženom trudu, prenesenom znanju i korisnim savjetima koji su me vodili tijekom izrade ovog diplomskog rada.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Piracetam.....	2
1.2. Kromatografske metode odjeljivanja.....	4
1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	7
1.3. Elektroanalitičke metode.....	10
1.3.1. Voltametrija.....	11
1.3.2. Ciklička voltametrija.....	12
1.3.3. Elektrode.....	15
 2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	 16
 3. MATERIJALI I METODE.....	 18
3.1. Kemikalije.....	19
3.2. Radni instrumenti.....	19
3.3. Uvjeti mjerenja.....	20
3.4. Priprema elektrode.....	20
3.5. Priprema otopina.....	20
 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	 22
4.1. Kromatografske metode analize piracetama.....	23
4.2. Ispitivanje elektrokemijskih svojstava piracetama.....	33
 5. ZAKLJUČAK.....	 40
 6. LITERATURA.....	 41
 7. SAŽETAK / SUMMARY.....	 43
 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

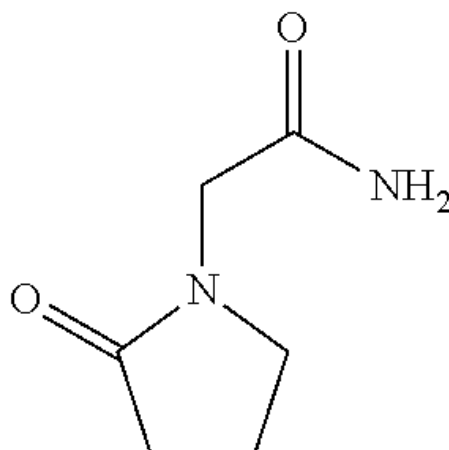
## 1. UVOD

## 1.1. PIRACETAM

Piracetam (2-okso-1-pirolidin acetamid), ciklički derivat gama-amino-maslačne kiseline, farmakoterapijski je svrstan u skupinu ostalih psihostimulansa i nootropika (Slika 1).

Molekulska formula je  $C_6H_{10}N_2O_2$ , a molarna masa 142.158 g/mol.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).



Slika 1. Struktura piracetama (www.mdpi.com)

Piracetam je indiciran za liječenje mioklonusa kortikalnog podrijetla, u monoterapiji ili kombinaciji sa drugim lijekovima, liječenje afazije uz intenzivne logopedске vježbe te dodatno liječenje disleksije u dobi od 8 i više godina, u kombinaciji s govornom terapijom ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Pokazuje afinitet prema AMPA glutamatnim receptorima djelujući kao njihov pozitivan modulator. Iako je po strukturi derivat gama-amino-maslačne kiseline, ne ulazi u interakciju sa GABA receptorima.

Piracetam modulira fluidnost membrana stanica mozga koja je u stanju oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije, smanjena. Veže se za polarne glave fosfolipida u strukturi membrana povećavajući tako njihovu fluidnost (Muller i sur., 1997).

Osim neuroprotektivnih, piracetam pokazuje reološke i antitrombotičke učinke. Djeluje hemoreološki na trombocite, eritrocite i stjenke krvnih žila povećavajući deformaciju

eritrocita te smanjujući nakupljanje trombocita, prijanjanje eritrocita uz stjenke krvnih žila i kapilarni vazospazam.

Apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta je brza i gotovo potpuna, vršne koncentracije u plazmi postižu se 1 sat nakon primjene. Hrana ne utječe na opseg apsorpcije, ali smanjuje  $C_{max}$  za 17% i povećava  $t_{max}$  sa 1 na 1,5 sat. Piracetam se ne veže za proteine plazme pa volumen raspodjele iznosi oko 0.6 l/kg. Prolazi krvno-moždanu i placentarnu barijeru te ulazi u sva tkiva osim adipoznog. Ne metabolizira se u ljudskom tijelu, a eliminacija nepromijenjenog piracetama odvija se filtracijom u bubrezima (80-100% doze).

U Republici Hrvatskoj registriran je kao Oikamid 400 mg kapsule ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

## 1.2. KROMATOGRAFSKE METODE ODJELJIVANJA

Pod pojmom kromatografskih metoda podrazumijeva se skup kromatografskih postupaka koji omogućuju odjeljivanje, a potom selektivno i osjetljivo dokazivanje/određivanje sastavnica u multikomponentnim uzorcima, uključujući i one gdje su sastavnice kemijski vrlo slične i prisutne u vrlo niskim koncentracijama (Luterotti, 2011).

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna faza), a temelj je odnos ravnotežnih koncentracija uspostavljenih u te dvije faze :

$$K = c_s / c_m$$

gdje je  $K$  koeficijent razdiobe, a  $c_s$  i  $c_m$  ravnotežne koncentracije otopljene tvari u nepokretnoj i pokretnoj fazi.

Uz veći  $K$  jače je zadržavanje otopljene tvari na nepokretnoj fazi. Što se sastavnice više razlikuju po vrijednostima  $K$  to se one zaustavljaju na različitim mjestima nepokretne faze i bolje međusobno odjeljuju.

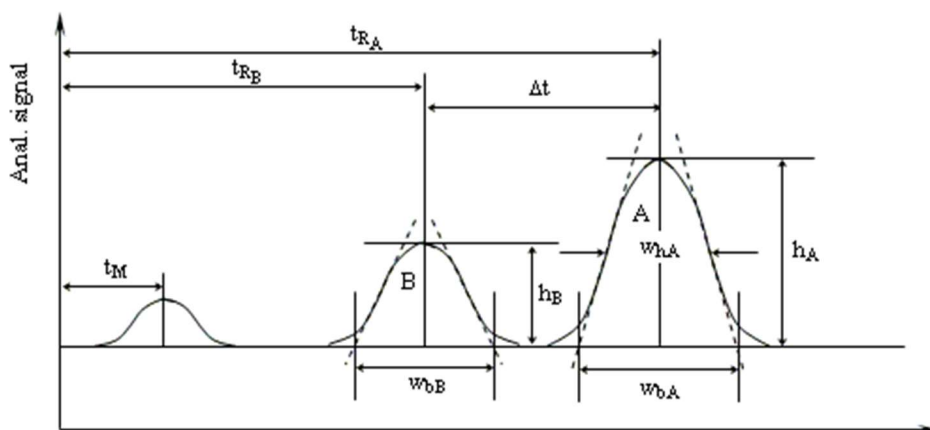
Klasifikacija kromatografskih metoda temelji se na mehanizmu odjeljivanja tako da se razlikuju adsorpcijska, razdjelna, ionsko-izmjenjivačka te kromatografija isključenjem.

Kromatografska analiza uključuje :

1. adsorpciju/razdiobu supstancija na nepokretnu fazu
2. odjeljivanje supstancija kontinuiranim protokom pokretne faze
3. detekciju odvojenih supstancija eluacijom
4. kvalitativnu ili kvantitativnu analizu odvojenih tvari

Postupak se može provoditi na koloni (stupcu) što se uglavnom koristi u svrhe odjeljivanja, ukoncentriravanja analita ili u kvantitativnoj analizi te na ravnoj plohi (papir ili tanki sloj) za kvalitativne kemijske analize.

Zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata zove se kromatogram.



Slika 2. Kromatogram smjese sastavnica A i B (moodle.srce.hr/2015-2016)

Svaki kromatogram (slika 2) određen je trima veličinama:  $w_{bA}$  i  $w_{bB}$  označuju širine pika na baznoj liniji,  $w_h$  širinu pika na polovici njegove visine ( $h$ ) dok su  $t_{RA}$  i  $t_{RB}$  ukupna vremena zadržavanja tvari A i B. Zadržano vrijeme pokretne faze ( $t_M$ ) ili mrtvo vrijeme je ono vrijeme potrebno da molekule pokretne faze prođu kroz kolonu. Također, to je vrijeme zadržavanja nezadržanog spoja tj. spoja koji se uopće ne zadržava na nepokretnoj fazi.

Korištenjem vremena zadržavanja ( $t_R$ ) može se izračunati prosječna linearna brzina putovanja analita ( $v$ ) :

$$v = L / t_R$$

gdje  $L$  označava duljinu kolone.

Faktor zadržavanja (faktor kapaciteta, odnos distribucije masa)  $k'$  dan je formulom :

$$k' = q_S / q_M = c_S V_S / c_M V_M = K (V_S / V_M)$$

gdje su  $V_M$  i  $V_S$  volumeni pokretne odnosno nepokretne faze,  $q_S$  i  $q_M$  količina otopljenog tvari u nepokretnoj tj. pokretnoj fazi.

Faktor kapaciteta i vrijeme zadržavanja povezani su izrazom :

$$k' = (t_R - t_M) / t_M$$



Faktor odjeljivanja (faktor selektivnosti,  $\alpha$ ) mjeri je odjeljivanja dviju supstancija :

$$\alpha = K_A / K_B = k'_A / k'_B = t'_{RA} / t'_{RB}$$

Razlučivanje pikova,  $R_s$ , karakterizira selektivnost cijelog sustava odnosno ukazuje na sposobnost kromatografske kolone da odvoji dva analita :

$$R_s = 1,18 \Delta t / (w_{hA} + w_{hB})$$

Broj teorijskih tavana,  $N$  i visina ekvivalentna teorijskom tavanu, HEPT karakteriziraju djelotvornost kolone. U svakom tavanu dolazi do uravnoteženja između nepokretne i pokretne faze. Putovanjem supstancije uzduž kolone dolazi do postupnog prijelaza iz jednog koraka odjeljivanja u slijedeći. Broj teorijskih tavana,  $N$ , dobiva se iz izraza :

$$N = L / HEPT = 16 (t_R / w_b)^2 = 5,545 (t_R / w_h)^2$$

Pri optimizaciji metode važan je kompromis između trajanja analize i djelotvornosti odjeljivanja. Varijable poput sastava i brzine protoka mobilne faze kao i temperatura kolone te volumen injektiranog uzorka moraju biti strogo kontrolirani jer znatno utječu na djelotvornost separacije.

Kromatografske metode odjeljivanja analitički se vrlo široko primjenjuju osobito za efikasna višestruka odjeljivanja koja omogućuju separaciju kemijski vrlo sličnih spojeva.

### 1.2.1. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High performance liquid chromatography, HPLC) razvijen je oblik tekućinske kromatografije gdje tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze veličine 3 do 10  $\mu\text{m}$  noseći sastavnice uzorka. (Nigović, 2015).

Povijesni razvoj HPLC-a započeo je 1941. godine kada su Martin i Synge predložili korištenje malih čestica stacionarne faze i visokih tlakova u tekućinskoj kromatografiji kako bi se poboljšalo odjeljivanje.

U tekućinskoj kromatografiji dolazi do značajnih interakcija između suspstancije i tekuće pokretne faze. Pokretna faza odabire se na temelju mehanizma odjeljivanja no kako se oni često međusobno preklapaju mobilna faza često se bira na temelju iskustva ili sustavnim postupkom multivarijacijskog optimiranja (Luterotti, 2011).

Mehanizam odjeljivanja može biti razdioba gdje se kao stacionarna faza koristi tekućina adsorbirana na čvrstoj tvari ili organski spojevi vezani na čvrsti nosač, a koristi se za odjeljivanje nepolarnih odnosno slabo polarnih tvari. Polarne supstancije odjeljuju se adsorpcijom najčešće na silikagelu kao polarnoj stacionarnoj fazi. Za odjeljivanje tvari ionskog karaktera koriste se ionski izmjenjivači kao stacionarna faza (polimeri sa sulfonskim i karboksilnim kiselim skupinama odnosno polimeri sa bazičnim aaminskim skupinama). Nadalje, odjeljivanje se može temeljiti na veličini čestica gdje se koriste polimerni gelovi različite veličine pora. Sve se više primjenjuje i kiralna kromatografija koja se koristi za odjeljivanje enantiomera, a pri kojoj se oni odjeljuju uspostavljanjem različitih stereokemijskih interakcija sa stacionarnom fazom na koju mogu biti vezani celulozni derivati, peptidi, cikloestrini.

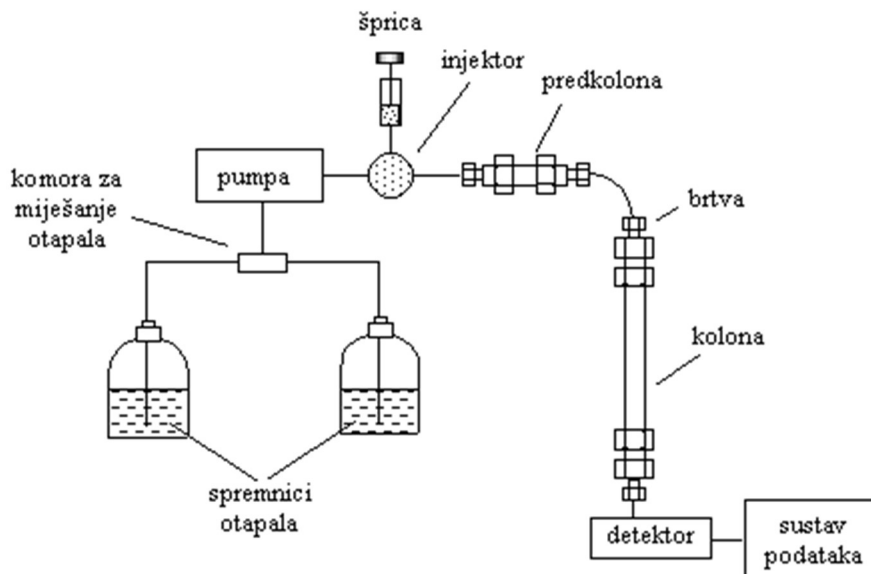
Kromatografija u kojoj je nepokretna faza polarna (silikagel), a pokretna faza manje polarna ili nepolarna naziva se kromatografija normalne faze, no u praksi se češće primjenjuje obrnuto fazna kromatografija gdje je površina silikagela kemijski modificirana kako bi se dobila nepolarna stacionarna faza. HPLC obrnutih faza u pravilu je metoda koja se prva ispituje kada se rješava neki novi analitički problem. Uobičajena nepokretna faza je  $\text{C}_{18}$  (oktadecilsilil silikagel, ODS), a zadržavanje tvari i selektivnost podešavaju se variranjem sastava mobilne

faze. Ovdje se polarni spojevi eluiraju prvi te što je tekuća faza polarnija, jače je zadržavanje nepolarnih spojeva.

Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće i oslobođena od otopljenih plinova ili suspendiranih čestica npr. pomoću mikroporoznih filtera pod vakuumom. Koriste se smjese otapala različite polarnosti. Da bi se procijenila polarnost otapala ustanovljene su eluotropske serije gdje su otapala na temelju indeksa polarnosti  $P'$  klasificirana kao jako polarna, slabo polarna te nepolarna.

Kod reverzno fazne kromatografije mobilna faza sastoji se od smjese vodenih pufera pomiješanih sa organskim otapalima kao što su acetonitril, metanol, tetrahidrofuran. Smanjenjem udjela organskog otapala u mobilnoj fazi produžuje se vrijeme zadržavanja ispitivanih susptancija.

U izokratnoj eluaciji sastav mobilne faze ne mijenja se tijekom analize, no ako ono ne dovodi do željenog odjeljivanja analita primjenjuje se gradijento eluiranje. U gradijentnoj se eluaciji sastav mobilne faze mijenja, bilo kontinuirano ili skokovito.



Slika 3. Shematski prikaz HPLC kromatografa (<https://free-zg.t-com.hr>)

Glavni dijelovi HPLC kromatografa su (slika 3) :

- Spremnici otapala

- Sustav za obradu otapala (uklanjanje otopljenih plinova)
- Crpka koja služi za ubacivanje mobilne faze pod visokim tlakom
- Sustav za unošenje uzorka (injektor)
- Kolona (najčešće cijev izrađena od nehrđajućeg čelika punjena česticama veličine 3 do 10  $\mu\text{m}$ )
- Detektor

Za detekciju često se koristi UV detektor s diodnim nizom (Diode array detector, DAD) koji se sastoji od niza dioda čime se omogućuje snimanje cijelog UV spektra eluiranog sastojka jer diodni niz pokriva cijelo UV područje. Primjenjuje se za analizu spojeva koji u svojoj strukturi imaju kromofor.

Kod elektrokemijskog detektora (ECD) odijeljeni analiti oksidiraju se ili reduciraju promjenom potencijala između radne i referentne elektrode pri čemu se mjeri struja koja teče između njih.

Analiti koji imaju više kromofora i krutu strukturu mogu se detektirati fluoroscencijskim detektorom koji mjeri fluoroscencijsku emisiju nakon pobuđivanja analita određenom valnom duljinom.

Detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku ELSD (Evaporative light-scattering detector, ELSD) radi na principu raspršenja mobilne faze s analitom pomoću dušika te ispravanja mobilne faze grijanjem. Količina raspršenog svjetla na česticama analita suspendiranim u plinu proporcionalna je masi analita.

Za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju analita koristi se maseni detektor (MS) kod kojeg se molekule ioniziraju te se određuje molekulska masa ionizirane molekule ili bilo kojeg fragmenta nastalog njenim cijepanjem.

### 1.3. ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih metoda kod kojih se podatak o koncentraciji, aktivitetu ili drugom termodinamičkom svojstvu određivane molekulske vrste dobiva u ovisnosti o električnom naponu, struji ili naboju (Wang, 2000).

Prema signalu pobude, čija je posljedica odvijanje elektrokemijske reakcije na radnoj elektrodi i mjerenoj varijabli iz koje se dobiva željeni analitički podatak, dijele se na : potenciometriju, voltometriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotenociometriju, kulometriju te konduktometriju (Nigović i Behetić, 2007).

Izbor odgovarajuće metode ovisi o vrsti problema koji se želi riješiti uzimajući u obzir redoks svojstva ispitivane supstancije te samog matriksa.

Elektroanalitičke metode imaju široku primjenu u farmaciji. Primjenjuju se u različitim stadijima istraživanja i razvoja lijekova kao i za identifikaciju te određivanje ljekovitih tvari u različitim uzorcima.

Velika prednost tih metoda je u tome što uglavnom nije potrebno prethodno provesti postupke odjeljivanja. To su metode jednostavne za korištenje, relativno kratkog vremena trajanja analize, jeftine te visoke osjetljivosti i selektivnosti što ih čini od velike važnosti u analitici (Nigović 2009).

### 1.3.1. VOLTAMETRIJA

Voltametrijom obuhvaća skupinu elektroanalitičkih tehnika (ciklička, diferencijalna pulsna, pravokutnovalna, *stripping* voltametrijom), a temelji se na mjerenju struje radne elektrode nastale kontinuiranim mijenjanjem njezinog potencijala.

U mjerenjima se upotrebljavaju tri elektrode: radna elektroda, pomoćna ili protuelektroda i referentna elektroda. Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode (kontrolira se signal pobude), a struja između radne i protuelektrode (mjeri se signal odaziva).

Redoks reakcija odvija se na radnoj elektrodi, a karakterizira ju mala površina čime se pospješuje polarizacija te se smanjuje razgradnja analita elektrolizom. Reakcije redukcije najčešće se odvijaju na kapajućoj ili statičnoj živinoj elektrodi dok se krute elektrode (staklasta ugljikova, platinska, zlatna elektroda) rabe za oksidacijske procese. Izbor radne elektrode veoma je važan za osjetljivost i reproducibilnost mjerenja (Nigović i Behetić, 2007).

Voltametrijske metode obuhvaćaju široko područje linearnosti ( $10^{-3}$ - $10^{-11}$ ). Prednost je tih metoda da većina pomoćnih tvari u farmaceutskom obliku nije elektroaktivna pa stoga ne utječu na voltametrijski odaziv lijekovite tvari (Ozkan i sur., 2003).

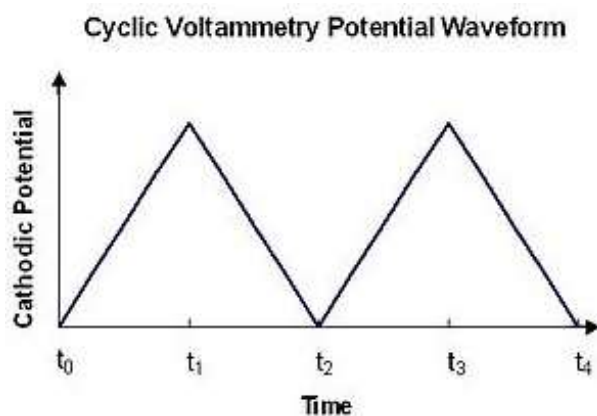
Primjenjuju se u kvantitativnoj analizi organskih i anorganskih tvari, za određivanje redoks potencijala, istraživanje kinetike i mehanizma redoks reakcije kao i za elektrokemijsku detekciju eluiranih analita u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti.

### 1.3.2. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

Ciklička se voltametrija primjenjuje za istraživanje kinetike i mehanizma redoks reakcija, određivanje redoks potencijala i broja izmijenjenih elektrona, istraživanje adsorpcijskih procesa i kemijskih reakcija koje prethode ili slijede prijenos elektrona (Wang, 2000).

Voltamogramom se prikazuje ovisnost struje o potencijalu, a oblik cikličkog voltamograma ovisi o brzinama prijenosa elektrona, prijenosa tvari i kemijskim reakcijama koje prate redoks reakcije.

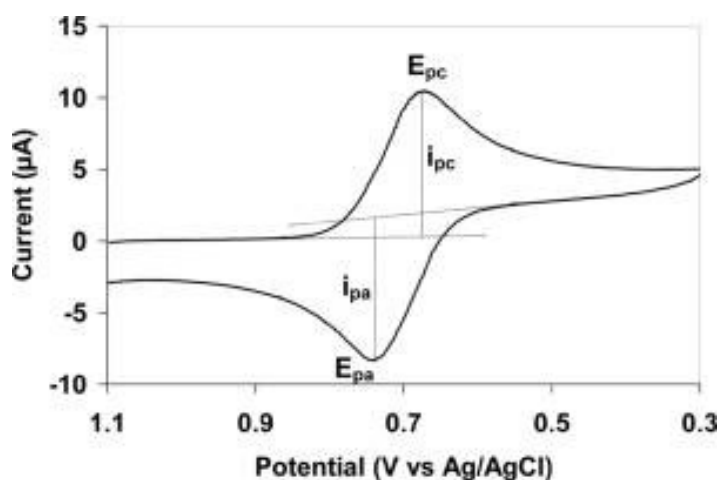
Potencijal radne elektrode mijenja se linearno, a kada dosegne određenu vrijednost, mijenja se smjer promjene potencijala do povratka na početnu vrijednost (Slika 4). Pritom se mjeri struja koja protječe kroz članak, odnosno radnu elektrodu.



Slika 4. Promjena potencijala u cikličkoj voltametriji (<https://chem.libretexts.org>)

Jakost struje raste kako se potencijal približava redoks potencijalu analita. Promjenom potencijala preko karakterističnog potencijala redoks procesa nastaje strujni vrh, a nakon toga dolazi do pada jakosti struje zbog smanjenja koncentracije analita u blizini elektrode. Povratkom potencijala na početnu vrijednost dolazi do oksidacije ili redukcije produkata nastalih u prvoj polovici ciklusa.

Parametri važni u cikličkoj voltametriji su vršne jakosti struje ( $i_{pc}$  i  $i_{pa}$ ) te potencijali vrha redukcije ( $E_{pc}$ ) i oksidacije ( $E_{pa}$ ) koji su karakteristični za svaki spoj, a koreliraju s njegovom sposobnošću da prima ili daje elektrone (Slika 5).



Slika 5. Općeniti prikaz cikličkog voltamograma (<https://chem.libretexts.org>)

Ako je proces prijenosa elektrona brz u odnosu na druge procese u otopini, reakcija je reverzibilna, a broj izmijenjenih elektrona može se odrediti prema formuli :

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 2,303 RT / nF$$

gdje je  $\Delta E_p$  razlika potencijala vrhova oksidacije i redukcije,  $R$  je opća plinska jednadžba ( $R = 8.314\,472\text{ J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ ),  $F$  predstavlja Faradayjevu konstantu ( $F = 96485.3365\text{ C mol}^{-1}$ ),  $T$  apsolutnu temperaturu, a  $n$  broj izmijenjenih elektrona.

Pri temperaturi od  $25^{\circ}\text{C}$ , za redoks reakciju prijenosa  $n$  elektrona  $\Delta E_p$  iznosi  $0,0592 / n\text{ V}$  odnosno  $60\text{ mV}$  za jedan elektron.

Koncentraciju i vršnu jakost struje pri reverzibilnoj reakciji povezuje Randles-Ševčikova jednadžba :

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A c_0 D^{1/2} v^{1/2}$$

gdje je  $i_p$  vršna jakost struje u amperima,  $A$  je površina elektrode u  $\text{cm}^2$ ,  $D$  difuzijski koeficijent u  $\text{cm}^2/\text{s}$ ,  $c_0$  je koncentracija otopine u  $\text{mol}/\text{cm}^3$ ,  $v$  brzina promjene potencijala u  $\text{V}/\text{s}$ , a  $n$  broj elektrona.



Kada je izmjena elektrona između radne elektrode i analita spora, reakcija se smatra ireverzibilnom. U tom slučaju pikovi su manje veličine te više razdvojeni, a vršna jakost struje definirana je jednačinom :

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

gdje je  $n_a$  broj elektrona u koraku prijenosa naboja, a  $\alpha$  koeficijent prijenosa. Vršna jakost struje i dalje je proporcionalna koncentraciji, ali je visina pika niža.

Ciklička je voltimetrija često prvi eksperiment koji se provodi u elektrokemijskom istraživanju (Nigović , 2007). Najčešće je korištena elektroanalitička metoda za dobivanje kvalitativnih informacija o redoks procesu, no u kvantitativnim se analizama koristi rijetko zbog niskih granica detekcije ( $10^{-5} - 10^{-6}$  M).

### 1.3.3. ELEKTRODE

Elektrode koje se upotrebljavaju u voltametrijii svojom konstantnom površinom osiguravaju reproducibilnost mjerenja.

Za oksidacijske se procese rabe krute elektrode, a najčešće korištena među njima je staklasta ugljikova elektroda (engl. Glassy Carbon Electrode, GCE). Osim dobrih kemijskih i mehaničkih svojstava, odlikuje se niskom stopom oksidacije, visokom kemijskom inertnošću te malom veličinom pora. Također pokazuje nisku permeabilnost za plinove i tekućine. (Dekanski i sur., 2001).

Danas se GCE široko primjenjuje u biomedicinskim istraživanjima, a njena površina vrlo se lako može modificirati.

U voltametrijskim analizama lijekova upotrebljavaju se modificirane čvrste elektrode koje povećavaju osjetljivost i selektivnost (Lawrence N.S., 2002). Površina elektrode može se promijeniti elektrokemijskom aktivacijom, primjenom ultrazvuka ili kemijskim načinima (adsorpcija, kovalentno vezanje sloja, miješanje s elektrodnom matriksom).

Kemijski izmijenjenu elektrodu karakterizira relativno tanak sloj odabranog spoja (ionski izmjenjivač, enzim, DNA, polimerni film, nanomaterijali) nanesen na površinu elektrode kako bi joj podario kemijsko, elektrokemijsko ili neko drugo svojstvo.

Staklasta ugljikova elektroda podvrgava se mehaničkoj predobradi koja uključuje poliranje elektrode aluminijskim česticama na tkanini za poliranje. No pokazano je da u usporedbi s mehaničkim predobrađenom površinom, ona koja je elektrokemijski predobrađena, ima veću aktivnost.

GCE između ostalog može se modificirati oblaganjem ugljikovim nanocjevčicama. Takve su elektrode osjetljivije, imaju nižu granicu određivanja i bržu kinetiku prijenosa elektrona.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U Republici Hrvatskoj piracetam je registriran samo u obliku kapsula pod nazivom Oikamid, no interventnim uvozom moguće je nabaviti tabletni oblik lijeka koji kod nas nije registriran (Nootropil). Kako je to supstancija koja djeluje na središnji živčani sustav i kao takva ima određena nuspojave (nervoza, hiperkinezija, konfuzija), potrebno je dobro razmotriti odnos rizika i koristi same terapije piracetamom.

Sama supstancija mora biti odgovarajuće farmaceutske kakvoće, zadovoljavajuće čistoće i određenog sadržaja što se ispituje tekućinskom kromatografijom prema propisu iz farmakopeje.

Razvoj novih analitičkih metoda za potrebe farmakopeje i kontrole kakvoće lijekova vrlo je značajan u području farmacije. Poželjno je da su metode koje se koriste u analitičkim ispitivanjima lijekova brze, jednostavne za izvođenje i zahtijevaju minimalnu obradu uzorka. Predložene nove analitičke metode moraju ponuditi ne samo visoku osjetljivost, već i prednosti obzirom na jednostavnost, brzinu i troškove analize.

Cilj ovog rada bio je prikazati dostupne kromatografske metode za analizu piracetama te ispitati mogućnost razvoja nove, elektrokemijske odnosno kromatografske metode s dosad nerazvijenom elektrokemijskom detekcijom piracetama.

### 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. KEMIČALIJE

Tijekom izrade ovog rada, korištene su navedene kemikalije:

- Piracetam (Pliva, Hrvatska)
- Borna kiselina,  $H_3BO_3$
- Fosfatna kiselina,  $H_3PO_4$
- Octena kiselina,  $CH_3COOH$
- Natrijev hidroksid NaOH
- Ultra čista voda
- Litijev perklorat  $LiClO_4$

### 3.2. RADNI INSTRUMENTI

Elektrokemijska mjerenja provedena tijekom izrade ovog rada (ciklička voltametrija) izvršena su na uređaju  $\mu$ -Autolab (Eco Chemie) spojenim na računalo. Program koji kontrolira mjerenja je GPES ver. 4.9.

Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika (Methrom, promjera 3 mm), a površina elektrode modificirana je ugljikovim nanocjevčicama suspendiranim u 0.3% Nafionu. Referentna elektroda je srebro/srebrov klorid ( $Ag/AgCl$ ) elektroda, a kao protuelektroda korištena je platinska žica.

Za izradu Britton-Robinson pufera i mjerenje pH vrijednosti otopina, korišten je pH-metar Mettler (digitalni pH-metar s kombiniranom staklenom elektrodom). Kalibracija je izvršena pomoću standardne otopine pufera poznatih pH vrijednosti  $pH_1=7.00\pm0.01$  i  $pH_2=4.00\pm0.01$ .

Kemijske supstance vagane su na analitičkoj vagi Mettler Tokedo AB-204-S.

### 3.3. UVJETI MJERENJA

Ciklički voltamogrami snimani su na elektrodi od staklastog ugljika, nemodificiranoj te modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama te na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora.

Primjenjeni raspon potencijala bio je od 0 do 1.750 V, a brzina promjene potencijala 100 mV/s.

### 3.4. PRIPREMA ELEKTRODE

Elektrodu od staklastog ugljika potrebno je pripremiti prije nanošenja modificirajućeg sloja. Elektroda se prvo polira vrlo sitnim abrazivnim česticama aluminijevog oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) na krpici za poliranje kružnim pokretima, nakon čega slijedi ispiranje destiliranom vodom i uranjanje u ultrazvučnu kupelj na 15 sekundi za uklanjanje ostalih čestica  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Elektroda se potom osuši te slijedi nanošenje suspenzija na površinu elektrode.

Nanosu se 10  $\mu\text{L}$  odgovarajuće suspenzije nanomaterijala Hamilton mikropipetom te ravnomjerno rasporedi po površini elektrode. Zatim se sloj modifikatora osuši na zraku ili po potrebi sušilom.

### 3.5. PRIPREMA OTOPINA

#### 3.5.1. Otopina piracetama

Matična otopina

Za pripremu matične otopine koncentracije  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , na analitičkoj vagi odvagane se 0.0028 g piracetama, kvantitativno prenese u tikvicu od 20,0 mL, otopi u 5 mL ultra čiste vode te se nadopuni istom do oznake.

## Radna otopina

Radna otopina koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M pripremljena je pipetiranjem 2,0 mL matične otopine pomoću mikropipete u tikvicu od 20,0 mL te nadopunjavanjem puferom različitog pH do oznake.

### 3.5.2. Otopina litijevog perklorata

Za pripremu 0,5 M otopine litijevog perklorata odvagano je 1,0639 krute supstancije, kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 20 mL te nadopunjeno ultra čistom vodom do oznake. Vrijednost pH otopine jest 7,33.

### 3.5.3. Otopina Britton-Robinson pufera

Otopina Britton-Robinson pufera pripremljena je u tikvici od 250,0 mL pipetirajući po 20,0 mL borne, fosforne i octene kiseline ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) koncentracija 0,5 M te nadopunjavanjem ultračistom vodom do oznake.

Različite pH vrijednosti puferske otopine dobivaju se dodavanjem odgovarajućeg volumena 0,2 M otopine NaOH.

### 3.5.4. Suspenzija ugljikovih nanocjevčica u 0,3% - tnoj otopini Nafiona u etanolu

Na analitičkoj vagi odvagane se 1 mg ugljikovih nanocjevčica, kvantitativno se prenese u tikvicu te se na ultrazvučnoj kupelji suspendira u 1 mL 0.3% etanolne otopine Nafiona. Suspenzija se čuva na hladnom.



#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

#### 4.1. KROMATOGRAFSKE METODE ANALIZE PIRACETAMA

Prikazan je razvoj kromatografskih metoda za analizu piracetama u farmaceutskim oblicima i biološkim tekućinama s naglaskom na način detekcije.

##### HPLC METODA ZA ODREĐIVANJE PIRACETAMA U TABLETAMA

Razvijena je jednostavna i brza HPLC metoda za rutinsku analizu piracetama u obliku tableta (Lestari i sur., 2005).

Ispitana je čistoća piracetama korištenog u istraživanju usporedbom IR-, UV-spektra i točke taljenja standarda i korištene supstancije te je utvrđena njegova farmaceutska čistoća .

U laboratorijskim uvjetima napravljene su filmom obložene tablete koje su sadržavale pet različitih koncentracija piracetama (640, 720, 800, 880 i 960 mg po tableti).

Kao mobilna faza korištena je smjesa metanola i vode (5:95) koja je pripravljana svakodnevno, elucija je izokratna.

LiChrosper 100 RP-18 kolona korišten je kao nepolarna stacionarna faza.

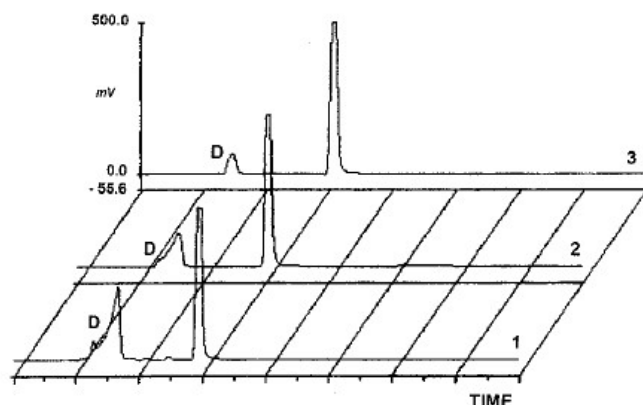
Detekcija supstancije, kao i ispitivanje čistoće, provedeni su pomoću DAD (Diode Array Detector) na valnoj duljini od 215 nm.

U postupku validacije metode određeni su linearnost, točnost, izdržljivost, granica dokazivanja i granica određivanja te radno područje. Da bi se odredila selektivnost metode, piracetam je bio izložen uvjetima prisilne razgradnje djelovanjem kiseline (HCl), lužine (NaOH) te oksidansa ( $H_2O_2$ ) kako bi se ispitao utjecaj razgradnih produkata piracetama na kromatografski pik piracetama.

U uvjetima prisilne razgradnje, analitički prinos kao mjera točnosti bio je smanjen, no čistoća pika i dalje je bila zadovoljavajuća (  $> 0.99$  ) što ukazuje na to da razgradni produkti piracetama ne interferiraju sa njegovim pikom. (slika 6).

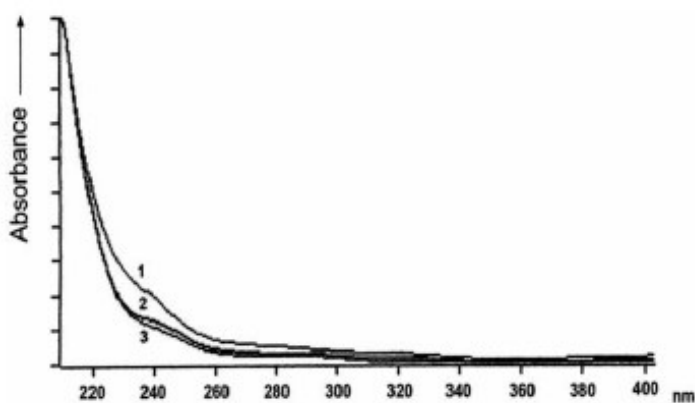
Pomoćne tvari laboratorijski pripremljenih tableta ekstrahirane su i podvrgnute kromatografskoj analizi pri čemu kromatogram nije pokazao nijedan pik. Što znači da kromatografski pik dobiven analizom uzoraka tableta u definiranim uvjetima potječe isključivo od piracetama.

Svi UV spektri kromatografskih pikova dobro koreliraju s UV spektrom pika standarda ( $r > 0.99$ ).



Slika 6. HPLC kromatogram uzoraka piracetama podvrgnutih prisilnoj razgradnji djelovanjem: 1.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 2.  $\text{NaOH}$ , 3.  $\text{HCL}$

UV spektri razgradnih produkata piracetama pokazuju sličnost sa UV spektrom samog piracetama.



Slika 7. UV spektar razgradnih produkata dobivenih obradom: 1.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 2.  $\text{NaOH}$ , 3.  $\text{HCL}$

Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost primjene predložene HPLC metode u rutinskim analizama kontrole kakvoće u farmaceutskoj industriji.

## HPLC METODA ZA ODREĐIVANJE PIRACETAMA U LJUDSKOJ PLAZMI

Razvijena je i validirana kromatografska metoda za određivanje piracetama u ljudskoj plazmi (Curticapean, Imre, 2007).

Za pripremu uzoraka korišten je standard ljudske plazme kojem su dodavane radne otopine piracetama različitih koncentracija. Dodavanjem perklorne kiseline dolazi do precipitacije proteina te se dobiva supernatant koji služi kao uzorak.

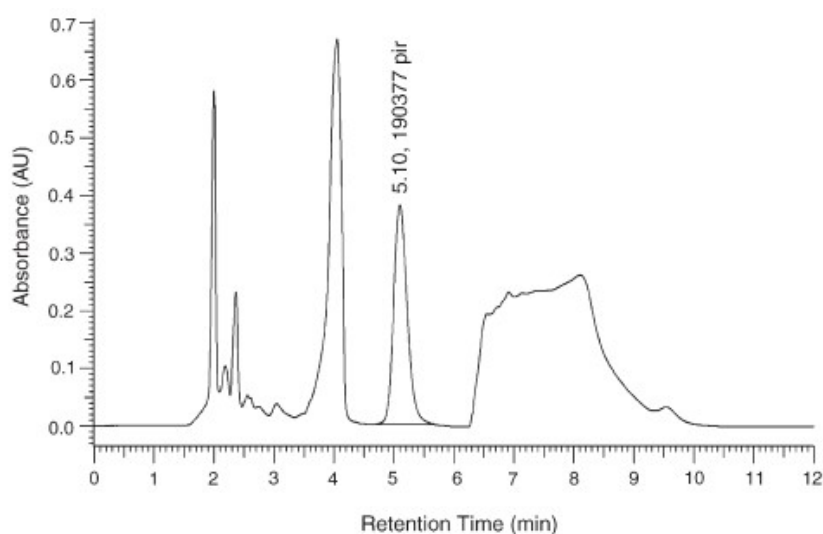
Kao mobilna faza korištena je vodena otopina 0.01 % perklorne kiseline, metanola te acetonitrila, a eluiranje je gradijentno kako bi se postiglo bolje razlučivanje pikova u kromatogramu.

S obzirom da se radi o obrnuto faznoj kromatografiji kao nepokretna faza korištena je C 18 kolona.

Korišten je UV detektor, a kvantitativna analiza provedena je na valnoj duljini od 200 nm.

Rezultati istraživanja pokazali su kako se pik piracetama može dobro odvojiti od ostalih pikova koji se javljaju analizom supernatanta odnosno nema interferencije endogenih supstancija s piracetamom (slika 8).

Predložena metoda korištena je u ispitivanju bioekvivalencije dvaju lijeka koji sadrže 800 mg piracetama.



Slika 8. HPLC kromatogram plazme s dodanim piracetamom

## IZOLACIJA, IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA RAZGRADNIH PRODUKATA PIRACETAMA UPLC METODOM

Razvijena je stabilitetno-indikativna metoda za određivanje sadržaja piracetama (Sahu i sur., 2014), a kako dotad nije objavljen nijedan rad koji bi analizirao piracetam koristeći tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC), upravo je ta tehnika korištena u ovom istraživanju.

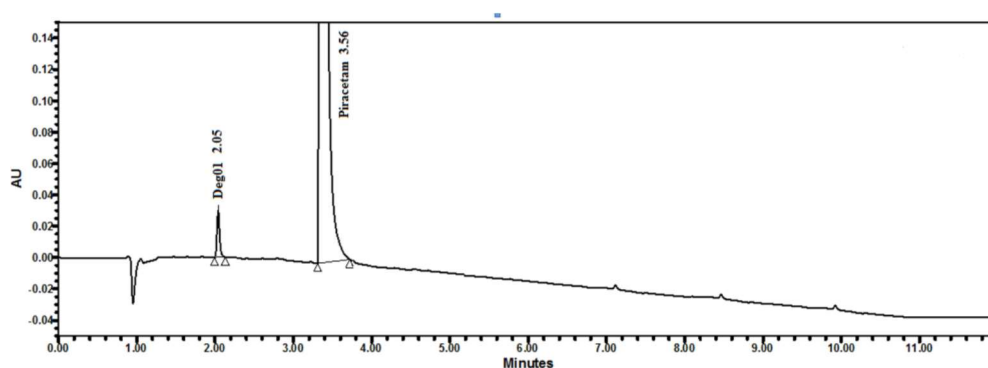
UPLC je nadogradnja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti tako da su načela odjeljivanja tih dviju tehnika jednaka, a glavna je razlika smanjenje veličine čestica stacionarne faze UPLC-a ( $<1.7\ \mu\text{m}$ ). Time se povećava broj teorijskih tavana te se postiže bolje razlučivanje i osjetljivost što omogućuje određivanje manjih koncentracija analita, a i vrijeme trajanja same analize se skraćuje.

U predstavljenom radu korištena je nepolarna stacionarna faza ( $\text{C}_{18}$  kolona), dok je mobilna faza smjesa acetonitrila i vode (25:75), a elucija izokratna.

Piracetam je podvrgnut prisilnoj razgradnji izlaganjem supstancije toplini, oksidaciji, fotolizi i hidrolizi (alkalna, kisela, neutralna).

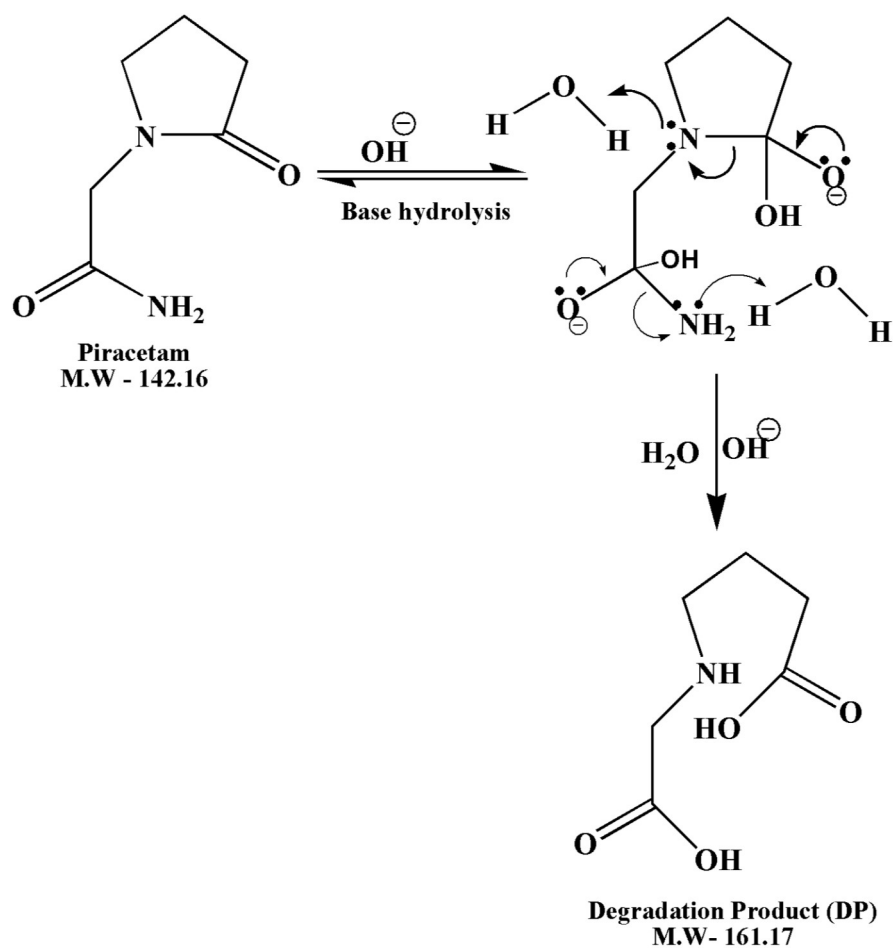
Piracetam se pokazao stabilan u svim uvjetima osim alkalnim dajući jedan razgradni produkt koji ima kraće vrijeme zadržavanja nego piracetam.

Nakon razgradnje piracetama u alkalnim uvjetima, razgradni produkt izoliran je UPLC-om (slika 9), te strukturno karakteriziran koristeći NMR tehniku, infracrvenu spektroskopiju te masenu spektrometriju.



Slika 9. UPLC kromatogram uzorka piracetama nakon obrade u alkalnom mediju

Korištena je spregnuta metoda UPLC-MS/MS gdje dolazi do fragmentacije razgradnog produkta piracetama te je na temelju omjera mase i naboja dobivenih fragmenata predložena njegova struktura te mehanizam razgradnje piracetama u alkalnim uvjetima (slika 10).



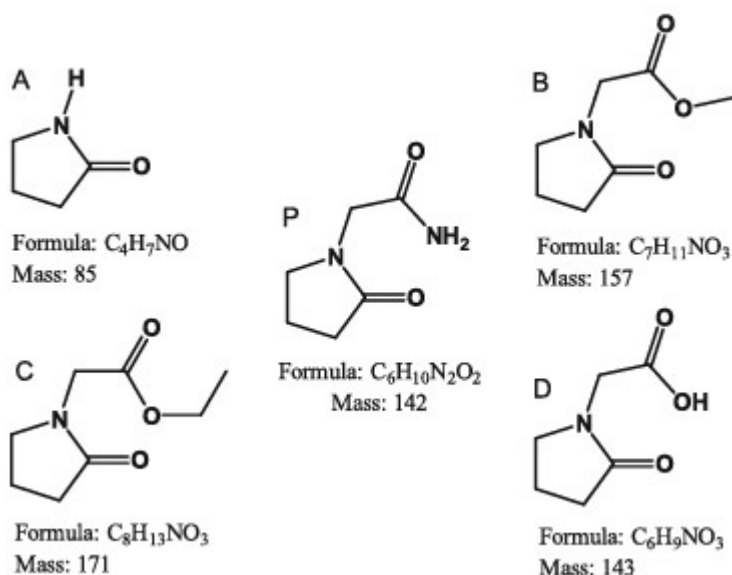
Slika 10. Pretpostavljeni mehanizam dobivanja razgradnog produkta piracetama

## USPOREDBA RAZLIČITIH KROMATOGRAFSKIH METODA ZA ANALIZU PIRACETAMA I NJEGOVIH ONEČIŠĆENJA

Lenzen i suradnici ispitali su prisutnost onečišćenja piracetama pomoću kromatografskih metoda sa različitim načinima detekcije (HPLC-DAD i HPLC-ESI-MS) te metode izravnog injektiranja u maseni spektrometar s različitim načinima ionizacije (DIP-APCI-MS i DIP-ESI-MS) (Lenzen i sur., 2016).

Poznata su četiri onečišćenja čije su strukture prikazane na slici 11.

Onečišćenja A,B i C nastaju u procesu sinteze dok je spoj D posljedica razgradnje samog piracetama.



Slika 11. Piracetam, (2-oksopirrolidin-1-il)-acetamid, (P) i njegova četiri onečišćenja: pirolidin-2-on (onečišćenje A), metil-(2-oksopirrolidin-1-il)-acetat (onečišćenje B), etil-(2-oksopirrolidin-1-il)-acetat (onečišćenje C), i (2-oksopirrolidin-1-il)-acetatna kiselina (onečišćenje D)

Čistoća piracetama može se odrediti infracrvenom spektroskopijom, no ona omogućuje identifikaciju samo onečišćenja D, dok se tankoslojnom tekućinskom kromatografijom sva onečišćenja i piracetam mogu razdvojiti, no bez dobivanja kvantitativnih podataka.

Kvalitativna i kvantitativna analiza moguća je uz tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti. U ovom ispitivanju korištena je nepolarna stacionarna faza (C<sub>18</sub> kolona), a izokratno eluiranje vršeno je pomoću smjese acetonitrila i pufera K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.

Nakon kromatografskog razdvajanja detekcija je provedena pomoću detektora s diodnim nizom te masenom spektrometrijom uz prethodnu elektrosprej ionizaciju (ESI-MS). U ovom slučaju detektirana su onečišćenja A i B.

DIP (direct inlet probe) omogućuje direktno injektiranje uzorka i ionizaciju bez njegove prethodne kromatografske obrade nakon čega slijedi analiza masenom spektrometrijom. Time je omogućena analiza uzorka u kojem se analit nalazi u vrlo maloj koncentraciji bez prethodne kromatografske separacije.

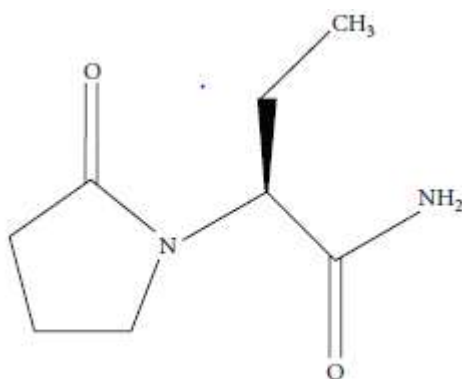
Ovim se radom pokazalo da ispitivanje čistoće piracetama DIP-ESI-MS metodom daje iste rezultate kao i HPLC-ESI-MS metoda, no uz kraće vrijeme analize i manji utrošak organskog otapala.

U analiziranom radu prikazana je i kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku nakon koje se u masenom spektru može detektirati protonirani piracetam, njegov fragment i protonirano onečišćenje A, dok se elektrosprej ionizacijom detektiralo i onečišćenje B.



## METODA ZA ISTOVREMENU ANALIZU PIRACETAMA I LEVETIRACETAMA U FARMACEUTSKIM OBLICIMA I BIOLOŠKIM TEKUĆINAMA

Levetiracetam spada u skupinu antiepileptika, a strukturno je vrlo sličan piracetamu (slika 12).

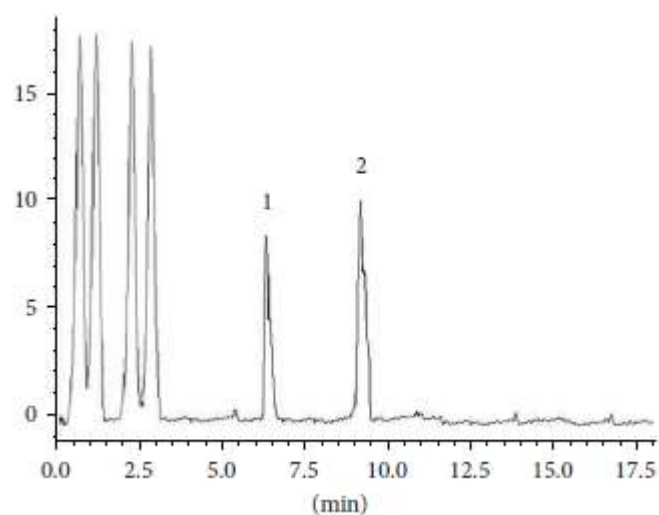


Slika 12. Struktura levetiracetama

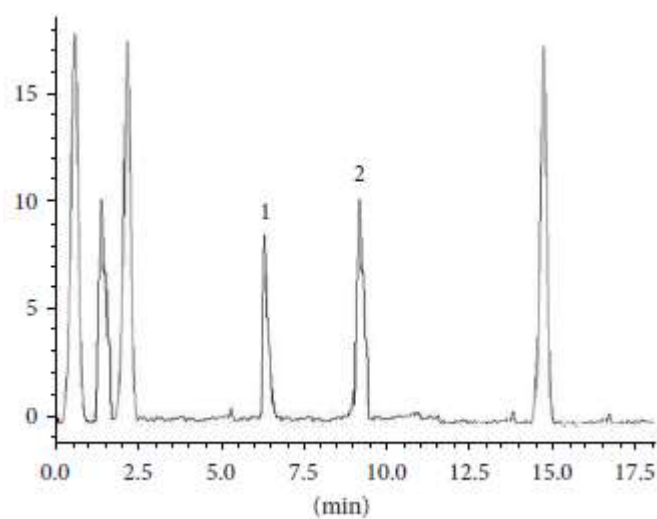
Razvijena je kromatografska metoda za istovremenu kvantitativnu analizu ovih strukturno vrlo sličnih spojeva jer dotada nisu pronađeni radovi koji se bave ovom tematikom (Siddiqui i sur., 2014).

Zajednička tehnika kojom su piracetam i levetiracetam analizirani pojedinačno jest tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti te je bila prikladna za razvoj nove reverzno fazne HPLC metode. Korištena je C<sub>18</sub> kolona, a pokretna faza sastojala se od smjese trietilamina (smanjuje interakcije između pozitivno nabijene amidne skupine analita i kiselih silanolnih skupina stacionarne faze što smanjuje širenje kromatografskog pika) i acetonitrila, dok je fosforna kiselina imala pufersko djelovanje. Korišten je UV detektor.

Za pripremu uzoraka korištene su komercijalne tablete te sirup piracetama i levetiracetama kao farmaceutski oblici. Za analizu u biološkim tekućinama radne otopine analita dodane su serumu odnosno supernatantu (slika 13) te urinu ispitivanih dobrovoljaca (slika 14).



Slika 13. Kromatogram seruma s dodanim piracetamom (1) i levetiracetamom (2)



Slika 14. Kromatogram urina dobrovoljaca s dodanim piracetamom (1) i levetiracetamom (2)

Ispitivanje stabilnosti supstancije u dozirnom obliku jedan je od regulatornih zahtjeva prilikom stavljanja lijeka u promet. Time se jamči sigurnost i integritet lijeka unutar predviđenog roka trajanja. Na temelju provedenih ispitivanja predlaže se prikladna formulacija aktivne supstancije, postupanje prilikom proizvodnih procesa te prikladni uvjeti skladištenja.

Provedeno je ispitivanje stabilnosti piracetama i levetiracetama u uvjetima ubrzanog starenja te stvarnog predviđenog roka trajanja njihovih formulacija.

Metoda je prošla postupak validacije te pokazala izvrsnu selektivnost, točnost, osjetljivost te linearnost. Na temelju provedenih ispitivanja, razvijena je stabilitetno-indikativna metoda za simultanu analizu piracetama i levetiracetama.

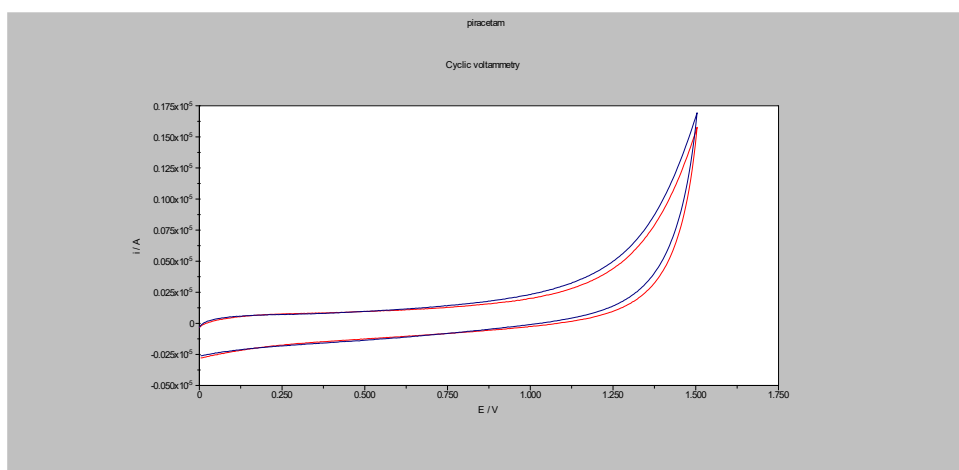
Pregledom danih radova prikazani su načini detekcije kromatografski odijeljenog/određivanog piracetama, najčešća je UV detekcija, a moguća je i masena spektrometrija različitim metodama ionizacije. No nije pronađen niti jedan rad s elektrokemijskim detektorom kao sastavnim dijelom kromatografske metode za analizu piracetama. Na temelju toga postavlja se pitanje može li se piracetam uopće elektrokemijski detektirati odnosno posjeduje li elektrokemijsku aktivnost.

Da bi se dobio odgovor na postavljeno pitanje, ispitana su njegova elektrokemijska svojstva tehnikom cikličke voltametrije.

## 4.2. ISPITIVANJE ELEKTROKEMIJSKIH SVOJSTAVA PIRACETAMA

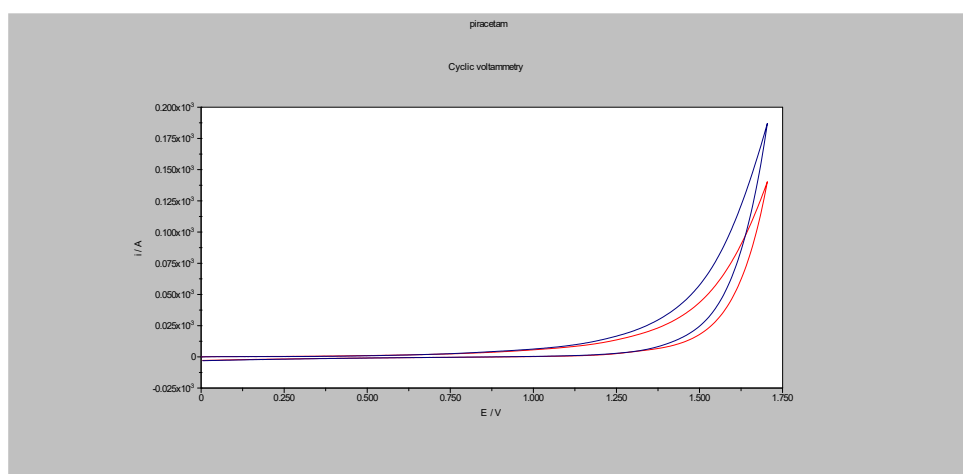
Sva mjerenja provedena su snimanjem cikličkog voltamograma u otopini piracetama pri različitim uvjetima (promjena raspona potencijala u uvjetima oksidacije i redukcije, promjena osnovnog elektrolita, promjena pH pufera, promjena vrste elektrode i modifikacija površine elektrode).

Ciklički voltamogram snimljen je na elektrodi od staklastog ugljika (engl. Glassy carbon, GC) u rasponu potencijala od 0 do 1,5 V u otopini piracetama u Britton-Robinson puferu različitih pH vrijednosti. Na voltamogramu nije uočen strujni vrh koji bi odgovarao oksidaciji piracetama u kiselom mediju (slika 15). Ovakav rezultat je očekivan zbog toga što se amidna skupina teško oksidira.



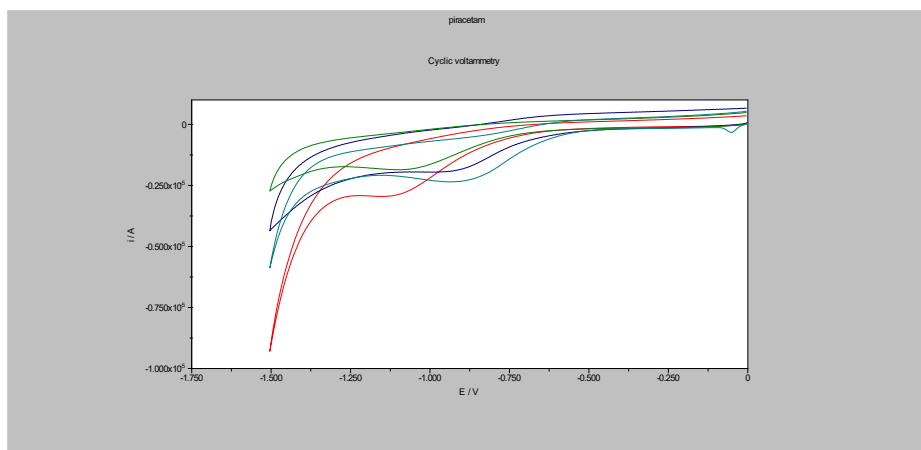
Slika 15. Ciklički voltamogrami  $1 \times 10^{-4}$  M otopine piracetama u Britton-Robinson puferu pH 2 (crveno) i pH 4 (plavo) snimljeni na GC elektrodi

Ciklički voltamogram otopine piracetama snimljen na GC elektrodi pri pH vrijednostima 6 i 8 (slika 16) također nije rezultirao voltametrijskim odgovorom lijeka što znači da se piracetam ne oksidira ni u neutralnom ni u alkalnom mediju. Otopina piracetama u puferu pH vrijednosti iznad 8 nije pripravljana zbog moguće razgradnje (hidrolize) piracetama u alkalnim uvjetima.



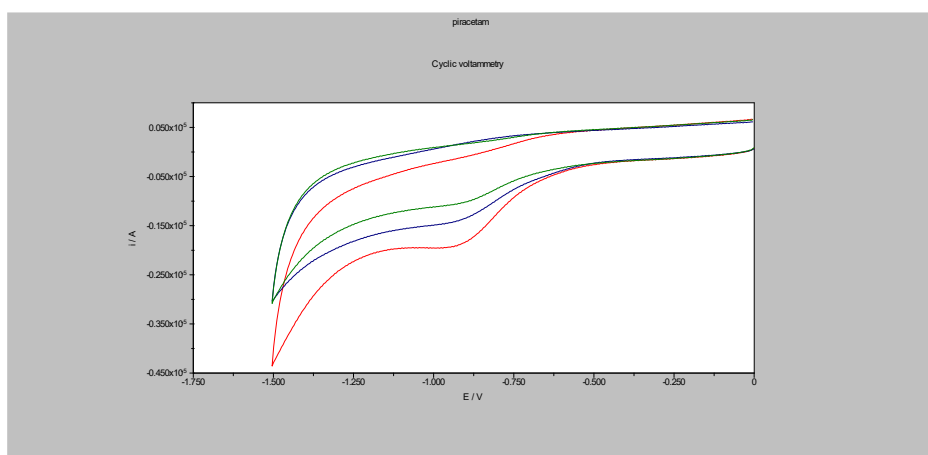
Slika 16. Ciklički voltamogrami  $1 \times 10^{-4}$  M otopine piracetama u Britton-Robinson puferu pH 6 (crveno) i pH 8 (plavo) snimljeni na GC elektrodi

Zatim su snimljeni ciklički voltamogrami na elektrodi od staklastog ugljika u rasponu potencijala od 0 do -1,5 V u otopini piracetama u Britton-Robinson puferu različitih pH vrijednosti (slika 17). Prije svakog ispitivanja redukcije u elektrokemijskoj se ćeliji provodi propuhivanje dušikom u trajanju od 120 sekundi kako bi se uklonio kisik iz radne otopine.



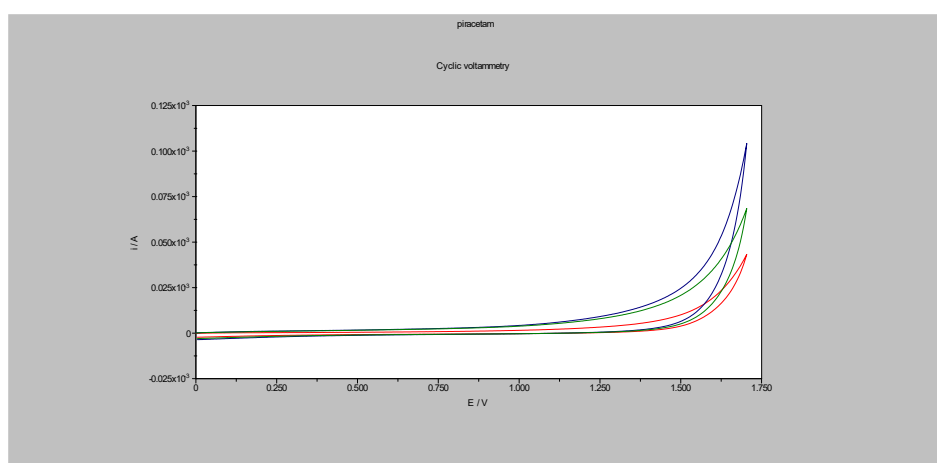
Slika 17. Ciklički voltamogrami  $1 \times 10^{-4}$  M otopine piracetama u Britton-Robinson puferu pH 2 (crveno), pH 4 (zeleno), pH 6 (tirkizno) i pH 8 (plavo) snimljeni na GC elektrodi

Ispitivana je mogućnost redukcije piracetama cikličkom voltametrijom u Britton-Robinson puferu upravo zbog toga što on pokriva široko područje pH, a zna se da voltametrijski odgovor ovisi i o pH vrijednosti osnovnog elektrolita. Na voltamogramima nisu uočeni izražajniji strujni vrhovi koji bi odgovarali redukciji piracetama, odnosno njegove karbonilne skupine. Pri pH 8 izvršena su ponovljena mjerenja (slika 18). Slaba porast struje kod vrijednosti potencijala od oko -1 V uzastopnim mjerenjima još se smanjuje te se ne može koristiti u analitičke svrhe za razvoj metode



Slika 18. Ciklički voltamogrami  $1 \times 10^{-4}$  M otopine piracetama u Britton-Robinson puferu pH 8 dobiveni uzastopnim mjerenjima na GC elektrodi: prvo mjerenje (crveno), drugo mjerenje (plavo), treće mjerenje (zeleno)

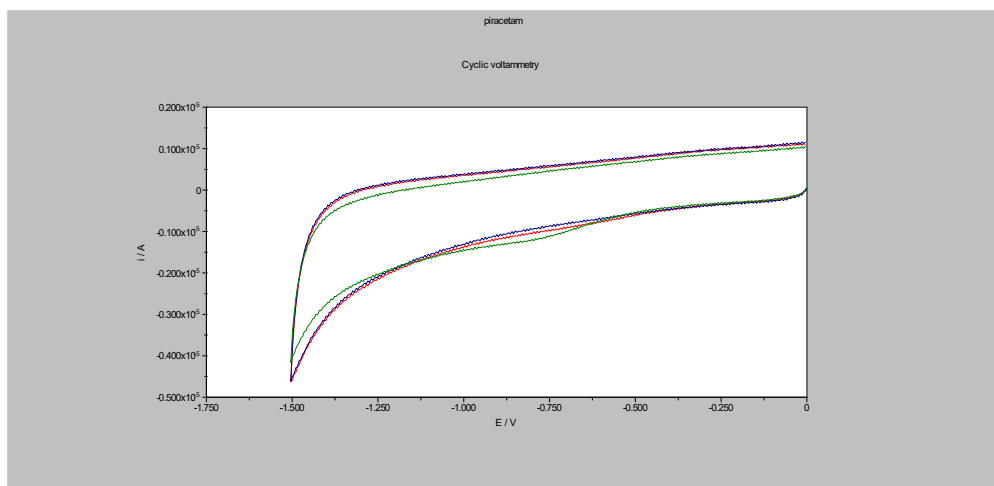
Mogućnost oksidacije i redukcije piracetama ispitana je potom u promijenjenom osnovnom elektrolitu, otopini litijevog perklorata. Mjerenja u rasponu potencijala od 0 do 1.7 V pokazala su da nema razlike u struji osnovnog elektrolita i otopine piracetama dviju različitih koncentracija što znači da se piracetam ne može oksidirati niti u tom mediju (slika 19).



Slika 19. Ciklički voltamogrami samog osnovnog elektrolita 0.5 M LiClO<sub>4</sub> (crveno) i otopine piracetama u 0.5 M LiClO<sub>4</sub> snimljeni na GC elektrodi (zeleno  $c=1 \times 10^{-3}$  M i plavo  $c=5 \times 10^{-3}$  M)

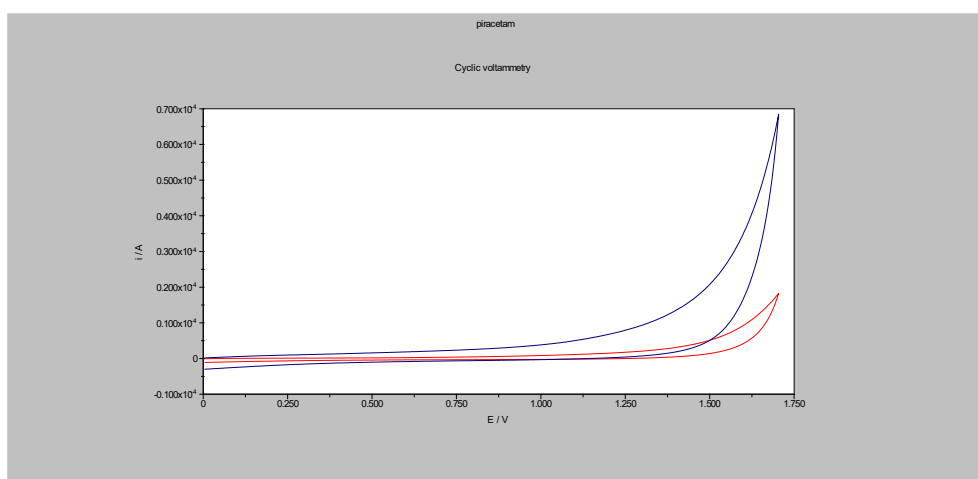
Mjerenja u rasponu potencijala od 0 do -1.5 V cikličkom voltametrijom pokazala su da nema razlike struje osnovnog elektrolita i otopine piracetama manje koncentracije ( $1 \times 10^{-3}$  M) što ukazuje da ne dolazi do redukcije piracetama (slika 20).

Voltamogram otopine piracetama pet puta veće koncentracije ( $5 \times 10^{-3}$  M) pokazuje vrlo mali porast struje na vrijednosti potencijala od oko -0.8 V, no vrh pika nije jasno definiran pa se ne može reći da se odnosi na redukciju karbonilne skupine piracetama.



Slika 20. Ciklički voltamogrami samog osnovnog elektrolita 0.5 M LiClO<sub>4</sub> (crveno) i otopine piracetama u 0.5 M LiClO<sub>4</sub> snimljeni na GC elektrodi (plavo  $c=1 \times 10^{-3}$  M i zeleno  $c=5 \times 10^{-3}$  M)

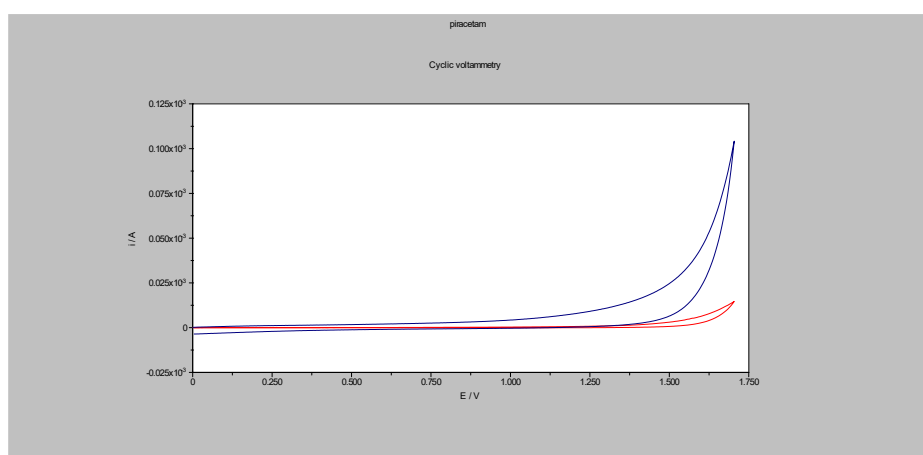
Smanjenjem koncentracije osnovnog elektrolita s 0,5 M otopine na 0,1 M otopinu litijevog perklorata, smanjuje se pozadinska struja u uvjetima oksidacije no i dalje nema definiranog voltametrijskog odgovora piracetama (slika 21).



Slika 21. Ciklički voltamogrami  $1 \times 10^{-3}$  M otopine piracetama u 0.1 M LiClO<sub>4</sub> (crveno) i 0.5 M LiClO<sub>4</sub> (plavo) snimljeni na GC elektrodi

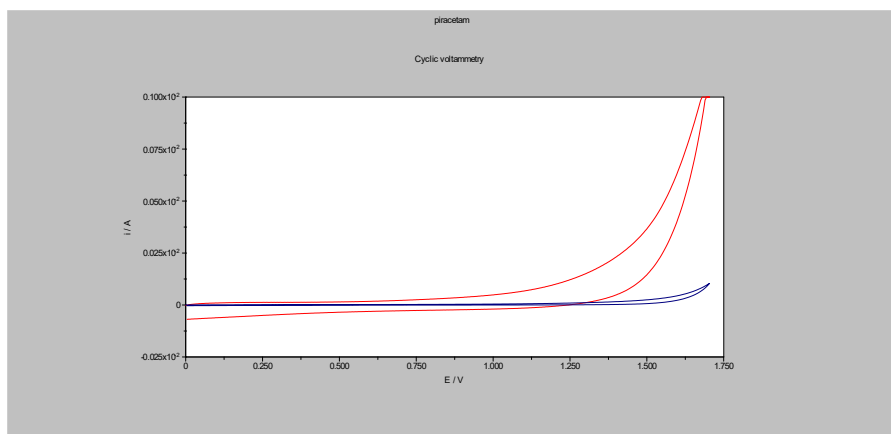


Dijamantna elektroda sa primjesama bora zbog svojih se dobrih svojstava koristi u elektroanalitičkim tehnikama. Odlikuju ju dobra mehanička čvrstoća, otpornost na habanje te visoka toplinska vodljivost. Također pokazuje manju pozadinsku struju zbog čega je i korištenja pri ovom mjerenju. No unatoč svemu navedenom na cikličkom se voltamogramu piracetama (slika 22) ne pojavljuje strujni vrh koji bi ukazivao na redoks reakciju otopine piracetama.



Slika 22. Ciklički voltamogrami  $5 \times 10^{-3}$  M otopine piracetama u 0.5 M  $\text{LiClO}_4$  snimljeni na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora (crveno) i elektrodi od staklastog ugljika (plavo)

Elektroda od staklastog ugljika modificirana ugljikovim nanočesticama pokazuje bolja svojstva u odnosu na nemodificiranu površinu GC elektrode kao što su dobra vodljivost i visoka kemijska stabilnost. Međutim ciklički voltamogram otopine piracetama (slika 23) i dalje ne pokazuje strujni vrh. Stoga se može zaključiti da u molekuli piracetama ne dolazi do oksidacije niti jedne njegove funkcionalne skupine.



Slika 23. Ciklički voltamogrami  $5 \times 10^{-3}$  M otopine piracetama u 0.5 M LiClO<sub>4</sub> snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama (crveno) i elektrodi od staklastog ugljika (plavo)

## 5. ZAKLJUČAK

Prikazan je razvoj različitih kromatografskih metoda za analizu piracetama u farmaceutskim oblicima i biološkim tekućinama s naglaskom na način detekcije.

Ispitivane su mogućnosti oksidacija i redukcija piracetama cikličkom voltametrijom. Mijenjani su radni uvjeti kao što su koncentracije radne otopine, vrsta osnovnog elektrolita i njegova pH vrijednost te radna elektroda s ciljem dobivanja voltametrijskog odgovora.

Na temelju izvršenih voltametrijskih mjerenja može se zaključiti da u molekuli piracetama ne dolazi do oksidacije dušika u pirolidonskom prstenu niti gubitka elektrona iz postranične amidne skupine. Također, u istraživanim uvjetima mjerenja ne dolazi niti do redukcije karbonilnog kisika pirolidinskog prstena.

Ovim mjerenjima potvrđena je pretpostavka da piracetam nije elektrokemijski aktivan u ispitivanim uvjetima što objašnjava činjenicu da nije pronađen nijedan rad u kojem se spominje elektrokemijska detekcija piracetama u sklopu njegove kromatografske analize.

## 6. LITERATURA

- Curticapean A, Imre S. New validated method for piracetam HPLC determination in human plasma. *J Biochem Biophys Methods*. 2007, 69, 273-281.
- Dekanski A, Stevanović J, Stevanović R, Nikolić BŽ, Jovanović VM. Glassy Carbon Electrodes. *Carbon*, 2001, 39, 1195-1205.
- Lawrence NS, Beckett EL, Davis J, Compton RG. Advances in the Voltammetric Analysis of Small Biologically Relevant Compounds. *Anal Biochem*. 2002, 303, 1-16.
- Lenzen C, Winterfeld GA, Schmitz OJ. Comparison of piracetam measured with HPLC-DAD, HPLC-ESI-MS, DIP-APCI-MS and a newly developed and optimized DIP-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2016, 408, 4103-4110.
- Lestari AD, Prasetyo AT, Palupi T, Umayah E, Yuwono M, Director GI. HPLC determination of piracetam in tablets; Validation of the method. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*, 2005, 28:9, 1407-1416.
- Luteroti S. Postupci odjeljivanja. Uvod u kemijsku analizu, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2011, str.208-233.
- Muller WE, Koch S, Scheuer K, Rostock A, Bortsch R. Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat and human brain. *Biochem Pharmacol*, 1997, 53, 40-135.
- Nigović B. Predavanja iz kolegija Analitika lijekova 2015, moodle.srce.hr/2015-2016/pristupljeno 2.7.2017.
- Nigović B. Application of electrochemistry to the analysis of pharmaceuticals and biological samples. The Analysis of Pharmacologically Active Compounds and Biomolecules in Real Samples, Injac, urednici, Kerala, Transworld Research Network, 2009, str.1-44.
- Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farm glas*, 2007, 163-175.
- Oikamid, 2014., www.halmed.hr, pristupljeno 17.6.2017.
- Ozkan SA, Uslu B, Aboul-Enein HY. Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids Using Modern Electroanalytical Techniques. *Crit Rev Anal Chem*, 2003, 33, 155-181.

Piracetam, 2005., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 17.6.2017.

Prikaz promjene potencijala u cikličkoj voltametriji 2017., <https://chem.libretexts.org>, pristupljeno 18.6.2017.

Prikaz HPLC instrumenta 2011., <https://free-zg.t-com.hr>, pristupljeno 2.7.2017.

Sahu K, Shaharyar M, Siddiqui AA, Sahu S. Isolation, Identification and Characterization of Degradation Product of Piracetam Using Analytical Techniques. *IJARSC*, 2014, 7, 8-16.

Siddiqui FA, Sher N, Shafi N, Sial AW, Ahmad M, Naseem M, Naseem H. Development of New Method for Simultaneous Analysis of Piracetam and Levetiracetam in Pharmaceuticals and Biological Fluids : Application in Stability Studies. *BioMed Res Int*, 2014. 758283. 8str.

Struktura piracetama, 2011., [www.mdpi.com](http://www.mdpi.com), pristupljeno 17.6.2017.

Wang J. Analytical Electrochemistry, New York, Wiley-VCH, 2000, str.68.

## 7. SAŽETAK

Piracetam spada u skupinu nootropnih lijekova i psihostimulansa te se kao takav propisuje za liječenje mioklonusa, afazije te disleksije.

Za njegovo određivanje najviše se koriste kromatografske metode s UV detektorom kao najjednostavnijim načinom detekcije. Kromatografske metode (HPLC, UPLC) koriste se za kvantitativnu analizu piracetama i njegovih onečišćenja. Masena spektrometrija kao način detekcije supstancija nakon odjeljivanja na kromatografskoj koloni daje detaljne informacije o strukturi spoja što je korišteno za objašnjenje strukture razgradnog produkta piracetama u alkalnim uvjetima.

S obzirom da nije pronađen nijedan rad koji govori o kromatografskoj metodi analize piracetama s elektrokemijskom detekcijom, cilj je bio ispitati elektrokemijska svojstva piracetama.

Provedena su mjerenja cikličkom voltametrijom, ispitivane su oksidacija i redukcija analita pri različitim pH vrijednostima. Mijenjani su uvjeti ispitivanja kao što su vrsta i koncentracija osnovnog elektrolita, koncentracija otopine piracetama te vrsta radne elektrode i modifikacija njezine površine.

Na temelju svega ispitanog, može se zaključiti da piracetam nije elektrokemijski aktivan te se kao takav ne može elektrokemijski detektirati.

## 7. SUMMARY

Piracetam belongs to a group of nootropic drugs and psychostimulants, and as such is prescribed for the treatment of myoclonus, aphasia and dyslexia.

For its determination, the most widely used chromatographic methods with a UV detector are the easiest detection method. Chromatographic methods (HPLC, UPLC) are used for quantitative analysis of piracetals and their contaminants. Mass spectrometry as a mode of detection of the substance after separation on the chromatographic column provides detailed information on the structure of the compound as used to illustrate the structure of the degradable product of piracetam in alkaline conditions.

Since no work was found about the chromatographic analysis of piracetam with electrochemical detection, the aim was to investigate electrochemical properties of piracetals.

Measurements with cyclic voltammetry were performed, oxidation and analytical reduction at various pH values were investigated. Changing conditions such as the type and concentration of the basic electrolyte, the concentration of the piracetam solution, the type of working electrode and the modification of its surface have changed.

Based on all the examined, it can be concluded that piracetam is not electrochemically active and can not be electrochemically detected as such.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION  
CARD



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### KROMATOGRAFSKE TEHNIKE ANALIZE PIRACETAMA I NJEGOVA ELEKTROKEMIJSKA SVOJSTVA

Lucija Bedeniković

#### SAŽETAK

Piracetam spada u skupinu nootropnih lijekova i psihostimulansa te se kao takav propisuje za liječenje mioklonusa, afazije te disleksije.

Za njegovo određivanje najviše se koriste kromatografske metode s UV detektorom kao najjednostavnijim načinom detekcije. Kromatografske metode (HPLC, UPLC) koriste se za kvantitativnu analizu piracetama i njegovih onečišćenja. Masena spektrometrija kao način detekcije supstancija nakon odjeljivanja na kromatografskoj koloni daje detaljne informacije o strukturi spoja što je korišteno za objašnjenje strukture razgradnog produkta piracetama u alkalnim uvjetima.

S obzirom da nije pronađen nijedan rad koji govori o kromatografskoj metodi analize piracetama s elektrokemijskom detekcijom, cilj je bio ispitati elektrokemijska svojstva piracetama.

Provedena su mjerenja cikličkom voltametrijom, ispitivane su oksidacija i redukcija analita pri različitim pH vrijednostima. Mijenjani su uvjeti ispitivanja kao što su vrsta i koncentracija osnovnog elektrolita, koncentracija otopine piracetama te vrsta radne elektrode i modifikacija njezine površine.

Na temelju svega ispitivanog, može se zaključiti da piracetam nije elektrokemijski aktivan te se kao takav ne može elektrokemijski detektirati.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 44 stranica, 23 grafičkih prikaza i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: piracetam, HPLC, ciklička voltametrija, elektrokemijska svojstva

Mentor: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Monika Barbarić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Analytics and Control of Medicines  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES OF PIRACETAMS ANALYSIS AND ITS ELECTROCHEMICAL PROPERTIES

Lucija Bedeniković

## SUMMARY

Piracetam belongs to a group of nootropic drugs and psychostimulants, and as such is prescribed for the treatment of myoclonus, aphasia and dyslexia.

For its determination, the most widely used chromatographic methods with a UV detector are the easiest detection method. Chromatographic methods (HPLC, UPLC) are used for quantitative analysis of piracetals and their contaminants. Mass spectrometry as a mode of detection of the substance after separation on the chromatographic column provides detailed information on the structure of the compound as used to illustrate the structure of the degradable product of piracetam in alkaline conditions.

Since no work was found about the chromatographic analysis of piracetam with electrochemical detection, the aim was to investigate electrochemical properties of piracetals.

Measurements with cyclic voltammetry were performed, oxidation and analytical reduction at various pH values were investigated. Changing conditions such as the type and concentration of the basic electrolyte, the concentration of the piracetam solution, the type of working electrode and the modification of its surface have changed.

based on all the examined, it can be concluded that piracetam is not electrochemically active and can not be electrochemically detected as such.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 44 pages, 23 figures and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Piracetam, HPLC, cyclic voltammetry, electrochemical properties

Mentor: **Biljana Nigović, Ph.D** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Marijana Zovko Končić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Monika Barbarić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: september 2017.